

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 9/16, 9/50</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/07072</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. März 1995 (16.03.95)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP94/02806 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 25. August 1994 (25.08.94) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 30 958.5      9. September 1993 (09.09.93)      DE P 44 16 818.7      11. Mai 1994 (11.05.94)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WEITSCHIES, Werner [DE/DE]; Gneisenaustrasse 65, D-10961 Berlin (DE). HELDMANN, Dieter [DE/DE]; Krefelder Strasse 3, D-10555 Berlin (DE). HAUFF, Peter [DE/DE]; Stendaler Strasse 84, D-12627 Berlin (DE). FRITZSCH, Thomas [DE/DE]; Elisenstrasse 2, D-12169 Berlin (DE). STAHL, Harald [DE/DE]; Ringstrasse 41/42, D-12205 Berlin (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> ACTIVE PRINCIPLES AND GAS CONTAINING MICROPARTICLES  <b>(54) Bezeichnung:</b> WIRKSTOFFE UND GAS ENTHALTENDE MIKROPARTIKEL  <b>(57) Abstract</b> <p>New active principle-containing microparticles are disclosed which contain besides the active principle(s) at least one gas or a gaseous phase. Also disclosed are agents containing said particles (microparticulate systems), their use for releasing active principles <i>in vivo</i> in an ultrasonically controlled manner, and processes for preparing the particles and the agents.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas oder eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten <i>in vivo</i> Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, diese enthaltende Mittel, deren Verwendung  
zur ultraschallgesteuerten Freisetzung von Wirkstoffen  
sowie Verfahren zu deren Herstellung**

5 Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas bzw. eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten *in vivo* Wirkstoff-Freisetzung, zur ultraschallunterstützten Zellinkorporation von  
10 Wirkstoffen (Sonoporation) sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

Mikropartikuläre Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreigabe gibt es schon seit vielen Jahren. Eine Vielzahl an möglichen Hüllsubstanzen und Wirkstoffen läßt sich hierzu verwenden. Ebenso gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Herstellungsverfahren.  
15 Zusammenstellungen über die verwendeten Hüllsubstanzen und Herstellungsverfahren finden sich z.B. bei: M. Bornschein, P. Melegari, C. Bismarck, S. Keipert: Mikro- und Nanopartikeln als Arzneistoffträgersysteme unter besonderer Berücksichtigung der Herstellungsmethoden, Pharmazie 44 (1989) 585-593 und M. Chasin, R. Langer (eds.): Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New  
20 York, 1990.

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus mikropartikulären Systemen beruht überwiegend auf Diffusions- oder Erosionsprozessen [vgl. C. Washington: Drug release from microdisperse systems: A critical review, Int. J. Pharm. 58 (1990) 1-12 und J. Heller:  
25 Bioerodible Systems, in: R.S. Langer, D.L. Wice (eds.): Medical applications of controlled release Vol. 1, CRC Press, Florida, 1984, p. 69-101].

Diese Prinzipien sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß die zeitliche Steuerbarkeit der Wirkstofffreisetzung aus mikrodispersen Systemen *in vivo* auf die Geschwindigkeit  
30 des Erosionsprozesses und/oder Diffusionsprozesses begrenzt ist und nach Applikation nicht weiter beeinflußt werden kann.

Die bislang bekannten Konzepte zur örtlichen Steuerung der Wirkstofffreisetzung *in vivo* aus mikropartikulären Systemen beruhen fast ausschließlich entweder auf unspezi-  
35 fischen Anreicherungen der mikropartikulären Wirkstoffträger in bestimmten Zielorganen wie Leber und Milz oder auf Maßnahmen zur gezielten Veränderung der Organverteilung *in vivo* nach Applikation durch die Veränderung der Oberflächeneigenschaften der mikropartikulären Systeme mit Hilfe von Tensiden oder

spezifitätsvermittelnden Stoffen wie z.B. Antikörpern [vgl.: R.H. Müller: Colloidal carriers for controlled drug delivery - Modification, characterization and in vivo distribution -, Kiel, 1989; S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter: Modification of the biodistribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants, Int. J. Pharm. 61 (1991), 85-100; S.S. Davis, L. Illum, J.G. Mcvie, E. Tomlinson (eds.): Microspheres and drug therapy, Elsevier science publishers B.V., 1984 und H. Tsuji, S. Osaka, H. Kiwada: Targeting of liposomes surface-modified with glycyrrhizin to the liver, Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 1004-1008]. Alle diese Verfahren bieten darüber hinaus jedoch keine weitere Möglichkeit den Ort der Wirkstofffreisetzung nach Applikation aktiv zu beeinflussen. Des weiteren ist es nicht möglich, das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe nach Applikation zu beeinflussen.

Erste Versuche, aktiv den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, beruhen auf der Möglichkeit, vorhandene, bzw. induzierte pH- oder Temperaturdifferenzen zur Freisetzung zu benutzen [vgl.: H. Hazemoto, M. Harada, N. Kamatsubara, M. Haga, Y. Kato: PH-sensitive liposomes composed of phosphatidyl-ethanolamine and fatty acid, Chem. Pharm. Bull. 38 (1990) 748-751 und J.N. Weinstein, R.L. Magin, M.B. Gatwin, D.S. Zaharko: Liposomes and local hyperthermia, Science 204 (1979) 188-191]. Diese Methoden sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß sie entweder begrenzt sind auf Fälle wo die erforderlichen Temperatur- bzw. pH-Differenzen bereits vorliegen (z.B. im Tumorgewebe) oder die entsprechenden zur Freisetzung erforderlichen Parameter nur durch aufwendige, z.T. invasive Maßnahmen herbeigeführt werden müssen. Darüber hinaus ist im letzteren Fall die örtliche Auflösung gering.

Ein weiteres bekanntes Verfahren, den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, besteht in der Verwendung von Mikropartikeln, die durch in den Partikeln verkapselte Ferrofluide über äußerlich angelegte Magnetfelder innerhalb bestimmter Körpersegmente anreicherbar sind [K.J. Widder, A.E. Senyei: Magnetic microspheres: A vehicle for selective targeting of drugs, Pharmac. Ther. 20 (1983) 377-395]. Die Verwendung derartiger Mikropartikel erfordert allerdings die gleichzeitige gezielte Anwendung starker, fokussierbarer Magnetfelder. Magnete, die derartige Felder erzeugen, sind jedoch in der Medizin wenig verbreitet. Desweiteren läßt sich die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe auf diese Weise nicht beeinflussen.

-3-

In der U.S. Patentschrift 4,657,543 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem die Freisetzung durch Ultraschalleinwirkung auf wirkstoffhaltige Polymerblöcke hervorgerufen wird. Dieser Effekt beruht im wesentlichen auf einer verstärkten Erosion des Polymers unter Schalleinwirkung. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß es nur für ortsfeste Implantate geeignet ist. Für deutliche Effekte ist zudem die Verwendung sehr hoher Schalldrücke oder von Dauerschallsignalen notwendig, die zur Gewebeschädigung führen können.

In der WO 92/22298 werden Liposomen beschrieben, die sich durch Einstrahlung von Ultraschall, der im Bereich der Resonanzfrequenz der Mikrobläschen liegt, zerstören lassen. Dabei tritt der verkapselte Wirkstoff aus. Die Resonanzfrequenz wird mit ca. 7,5 MHz angegeben. Diagnostischer Ultraschall derart hoher Frequenz weist jedoch aufgrund der hohen Absorption durch Körpergewebe nur eine geringe Eindringtiefe (wenige Zentimeter) auf. Die beschriebenen Liposomen sind deshalb nur für die Freisetzung von Wirkstoffen in oberflächennahen Gebieten des Körpers geeignet.

Bei der Verwendung von Nukleinsäuren als Wirkstoffe werden in der Literatur zwei Systeme basierend auf viralen Vektoren bzw. nicht-virale Vektoren beschrieben. In vivo werden derzeit als virale Vektoren Retro-, Adeno- und Herpesviren (bzw. deren Rekombinant) und als nicht-virale Vektoren Liposomen und Liganden zelloberflächenspezifischer Rezeptoren untersucht (G. Y. Wu & C. H. Wu: Delivery systems for gene therapy, Biotherapy, 3 (1991) 87-95 und F. D. Ledley: Are contemporary methods for somatic gene therapy suitable for clinical applications?, Clin Invest Med 16 (1) (1993) 78-88).

Erste Untersuchungen zur Verwendung der Gentherapie beim Menschen konzentrieren sich auf genetisch bedingte Erkrankungen wie z. B. alpha-1-Antitrypsinmangel, zystische Fibrose, Adenosindesaminasemangel und maligner Tumoren wie z. B. Melanome, Mammatumore und Intestinalkarzinome.

Bislang sind jedoch keine Vektoren bekannt, die sowohl eine räumliche als auch zeitliche Steuerung der Freisetzung von Nukleinsäuren ermöglichen.

Es besteht daher für vielfältige Zwecke weiterhin ein Bedarf an gezielt applizierbaren Formulierungen, die die genannten Nachteile des Standes der Technik überwinden, d.h. bei denen sowohl der Ort und Zeitpunkt der Wirkstofffreisetzung als auch die Menge der abgegebenen Substanz, gezielt durch einfache, nicht invasive Maßnahmen gesteuert werden kann. Die Formulierungen sollten darüber hinaus eine hohe Stabilität, insbesondere in Hinblick auf mechanische Einflüsse, aufweisen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, derartige Formulierungen zur Verfügung zu stellen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung zu schaffen.

Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

5

Es wurde gefunden, daß bei mikropartikulären Systemen, die zusammengesetzt sind aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln, die aus einer bioabbaubaren Hülle und einem gas- und wirkstoffhaltigen Kern bestehen, überraschenderweise bei der Bestrahlung mit diagnostischen Ultraschallwellen in  
10 einem Frequenzbereich der unterhalb der Resonanzfrequenz der Partikel liegt, die Hülle dieser Partikel zerstört wird und so der (die) verkapselte(n) Wirkstoff(e) gezielt freigesetzt wird (werden).

Die Erfindung betrifft somit neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die neben dem Wirkstoff ein Gas, eine gasförmige Phase oder Gasgemische enthalten, sowie  
15 mikropartikuläre Systeme bestehend aus den erfindungsgemäßen Mikropartikeln sowie einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium.

Die Partikel weisen eine Dichte kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$ , bevorzugt kleiner als  $0,6 \text{ g/cm}^3$  auf und haben eine Größe im Bereich von  $0,1 - 8 \text{ }\mu\text{m}$ , vorzugsweise  $0,3 - 7 \text{ }\mu\text{m}$ . Im  
20 Falle von verkapselten Zellen beträgt die bevorzugte Partikelgröße  $5-10 \text{ }\mu\text{m}$ . Aufgrund der geringen Größe verteilen sie sich nach i.v. Injektion innerhalb des gesamten Gefäßsystems. Unter Sichtkontrolle auf dem Monitor eines diagnostischen Ultraschallgerätes kann dann durch Intensivierung des Schallsignals eine vom Anwender  
25 gesteuerte Freisetzung der enthaltenen Stoffe herbeigeführt werden, wobei die zur Freisetzung erforderliche Frequenz unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikropartikel liegt. Geeignete Frequenzen liegen im Bereich von  $1 - 6 \text{ MHz}$ , bevorzugt zwischen  $1,5$  und  $5 \text{ MHz}$ .

Dadurch ist erstmalig innerhalb des gesamten Körpers eine kombinierte Steuerung der Wirkstofffreigaberate und des Wirkstofffreigabeortes durch den Anwender möglich.  
Diese Freisetzung, durch Zerstörung der Partikelhülle, ist überraschenderweise auch mit Ultraschallfrequenzen weit unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikrobläschen mit in der medizinischen Diagnostik üblichen Schalldrücken möglich, ohne daß es zu einer  
35 Erwärmung des Gewebes kommt. Dieses ist besonderes deswegen bemerkenswert, weil auf Grund der großen mechanischen Stabilität der Partikelhülle - wie sie z.B. in Hinblick auf Lagerstabilität von Vorteil ist - eine Zerstörung der Hülle mit relativ energiearmer Strahlung nicht zu erwarten war.

Die Wirkstofffreigabe kann aufgrund des hohen Gasanteils der Partikel und der damit verbundenen Echogenität, *in vivo* über die Abnahme des empfangenen Ultraschallsignals kontrolliert werden.

5

Weiterhin wurde gefunden, daß bei Anwendung erfindungsgemäßer mikropartikulärer Systeme ein verbesserter Transfer von Wirkstoffen in die Zellen erzielt werden kann (Sonoporation).

- 10 Außerdem wurde gefunden, daß die aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen freigesetzten Wirkstoffe im Vergleich zu dem reinen Wirkstoff überraschenderweise eine erhöhte pharmakologische Wirksamkeit zeigen.

- 15 Die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme sind aufgrund ihrer Eigenschaften für eine gezielte Freisetzung von Wirkstoffen und deren erhöhten Transfer in die Zielzellen unter Einwirkung von diagnostischem Ultraschall geeignet.

- Als Hüllmaterialien für die Gas/Wirkstoff enthaltenden Mikropartikel eignen sich prinzipiell alle biologisch abbaubaren und physiologisch verträglichen Materialien, wie
- 20 z.B. Proteine wie Albumin, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate wie z.B. succinylierte Gelatine, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol (z.B. mit Polyethylenglykol konjugiertes Albumin), Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, biologisch abbaubare synthetische Polymere wie Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und
- 25 Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton und deren Gemische. Besonders geeignet sind Albumin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polycarbonate, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus
- 30 Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton.

- Das (die) eingeschlossene(n) Gas(e) können beliebig gewählt werden, wobei jedoch physiologisch unbedenkliche Gase wie Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase, halogenierte Kohlenwasserstoffe, SF<sub>6</sub> oder deren Gemische bevorzugt sind. Ebenfalls geeignet sind Ammoniak, Kohlendioxid sowie dampfförmige Flüssigkeiten, wie z.B.
- 35 Wasserdampf oder niedrigsiedende Flüssigkeiten (Siedepunkt < 37 °C).

Der pharmazeutische Wirkstoff kann ebenfalls beliebig gewählt werden. Als Beispiele seien genannt Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile von bakteriologischen Zellwänden, Peptide wie z.B. Endothelin, Proteine, Glycoproteine, Hormone, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, trombolytische Agentien, Tumornekrose Faktoren, Zytokine (wie z.B. Interleukine, koloniestimulierende Faktoren wie GM-CSF, M-CSF, G-CSF) und/oder Prostaglandine. Die erfindungsgemäßen Mikropartikeln eignen sich insbesondere zur Verkapselung von Nukleinsäuren, ganzen Zellen und/oder Zellbestandteilen, die (z.B. bei der Gentherapie) im Zielorgan mittels Ultraschall freigesetzt werden sollen.

10

Der Begriff pharmazeutischer Wirkstoff schließt sowohl die natürlichen, als auch die synthetisch oder gentechnologisch hergestellten Wirkstoffe ein.

Bevorzugt werden pharmazeutische Wirkstoffe verwendet, deren applizierte Dosis (bei bolusförmiger Injektion) 100 mg pro Anwendung nicht übersteigt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen, wie zuvor beschrieben, eine Erhöhung der pharmakologischen Wirksamkeit erreicht wird, wobei in verschiedenen Fällen eine Wirkungsverstärkung beobachtet werden kann, wodurch die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme auch für Wirkstoffe einsetzbar sind, die auf konventionellem Wege im Bolus höher als 100 mg pro Anwendung dosiert werden müssen.

20

Sind noch höhere Dosierungen erforderlich, so empfiehlt es sich die Mittel über einen längeren Zeitraum als Infusionslösung zu verabreichen

25

Ogleich es über die genannten Limitierungen hinaus keine weiteren Einschränkungen gibt, können die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme besonders dort mit Vorteil eingesetzt werden, wo es aufgrund einer geringen *in vivo* Lebensdauer des Wirkstoffs in freier Form nicht oder nur in beschränktem Ausmaß möglich ist, das Zielorgan zu erreichen, ohne daß zuvor Zersetzung des Wirkstoffs eingetreten ist. Zu derartigen Wirkstoffen zählen verschiedene Hormone, Peptide, Proteine, Zellen und deren Bestandteile sowie Nukleinsäuren.

30

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel besteht darin, daß zunächst in an sich bekannter Weise (DE 38 03 972, WO 93/00933, EP 0 514 790, WO 92/17213, US 5,147,631, WO 91/12823, EP 0 048 745) gasgefüllte Mikropartikel hergestellt werden. Erfindungsgemäß werden diese dann mit in überkritischen Gasen gelösten Wirkstoffen befüllt. Dazu werden die mit geeigneten

35



Verfahren getrockneten (z.B. Gefriertrocknung) gashaltigen Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas in einem Autoklaven behandelt. Zweckmäßigerweise verfährt man, indem Wirkstoff und gasgefüllter Mikropartikel gemeinsam in einem Autoklaven vorgelegt werden und dieser anschließend mit dem überkritischen Gas oder Gasgemisch befüllt wird. Als überkritische Gase eignen sich je nach Wirkstoff alle Gase, die in einen überkritischen Zustand überführt werden können, insbesondere jedoch überkritisches Kohlendioxid, überkritischer Stickstoff, überkritischer Ammoniak sowie überkritische Edelgase. Nach der Behandlung der Mikropartikel mit der Lösung des Wirkstoffs im überkritischen Gas oder Gasgemisch wird der überschüssige Wirkstoff an der äußeren Oberfläche der Mikropartikel falls erforderlich durch Waschen der Mikropartikel in einem geeigneten Medium entfernt und die so gereinigten Partikel gewünschtenfalls gefriergetrocknet. Dieses Verfahren ist für alle Wirkstoffe geeignet, die sich in überkritischen Gasen oder Gasgemischen lösen, wie z.B. Peptide oder lipophile Arzneistoffe .

Ein alternatives Verfahren, das sich insbesondere zur Verkapselung von Wirkstoffen die in überkritischen Gasen oder Gasgemischen unlöslich sind (wie z.B. Proteine, zuckerhaltige Verbindungen), eignet, beruht auf der Verkapselung einer wirkstoffhaltigen wäßrigen Phase mittels einer Mehrfachemulsion. Als besonders geeignet haben sich Wasser/Öl/Wasser (W/O/W)-Emulsionen erwiesen. Dazu wird das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01 - 20 % (m/V) gelöst. In diese Lösung wird eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert, daß eine Emulsion vom Typ W/O entsteht. Beide Lösungen können zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten. Bevorzugt ist es jedoch, aus Gründen der im allgemeinen begrenzten biologischen Verträglichkeit von Emulgatoren, auf diese weitgehend zu verzichten. Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, der inneren wäßrigen Phase pharmazeutisch akzeptable Quasiemulgatoren wie z.B. Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine, Albumin oder Dextrane im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25 % zuzusetzen. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, in der inneren wäßrigen Phase, gegebenenfalls zusätzlich zu den anderen verwendeten Hilfsstoffen, 0,1 - 20 % (m/V) eines gut wasserlöslichen pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Zuckers oder Zuckeralkohols, wie z.B. Natriumchlorid, Galaktose, Mannitol, Laktose, Saccharose, Glukose, Natriumhydrogenphosphat zu lösen. Es kann außerdem vorteilhaft sein, die innere wäßrige Phase vor der Emulgierung mit der verwendeten organischen Phase zu sättigen. Die hergestellte Emulsion vom Typ W/O sollte eine mittlere Tröpfchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10 µm aufweisen. Diese Emulsion wird unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen

- Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gegeben. Das organische Lösungsmittel wird unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt. Die erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel werden erforderlichenfalls gewaschen und anschließend so getrocknet, daß die innere
- 5 Wasserphase ohne Zerstörung der Mikropartikel entfernt wird. Grundsätzlich geeignete Trocknungsverfahren sind die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung. Bevorzugt ist die Gefriertrocknung. Dazu wird in der Suspension der Mikropartikel ein gerüstbildender Hilfsstoff wie z.B. Zucker, Zuckeralkohole, Gelatine, Gelatine-Derivate, Albumin, Aminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol in einer
- 10 Konzentration von ca. 0,5 - 20 % (m/V) gelöst. Die Suspension wird anschließend bei möglichst tiefen Temperaturen, bevorzugt unterhalb ca. -30 °C eingefroren und dann gefriergetrocknet. Nach der Gefriertrocknung und Redispergierung in einem geeigneten Suspensionsmedium, lassen sich die entstandenen gashaltigen Mikropartikel der erforderlichen Dichte durch Flotation oder Zentrifugation, von eventuell ebenfalls
- 15 vorhandenen soliden oder immer noch wassergefüllten Mikropartikeln abtrennen und falls erforderlich, möglichst unter Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriertrocknen. Die Mikropartikel enthalten dann den verkapselten Wirkstoff und Gas bzw. gasförmige Phase nebeneinander.
- 20 Die Herstellung der erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme aus den nach den vorbeschriebenen Verfahren hergestellten Partikel erfolgt durch Resuspendieren der Partikel in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium. Das Resuspendieren in einem geeigneten Medium kann sich unmittelbar an den letzten Verfahrensschritt (die Gefriertrocknung) anschließen, kann aber gewünschtenfalls auch
- 25 erst durch den behandelnden Arzt vor der Anwendung erfolgen. In letzterem Fall liegen die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme als ein Kit, bestehend aus einem ersten die Partikel enthaltenden Behälter und einem zweiten das Suspensionsmedium enthaltenden Behälter, vor. Die Größe des ersten Behälters ist so zu wählen, daß auch das Suspensionsmedium in diesem vollständig Platz findet. So
- 30 kann z.B. mittels einer Spritze über eine im Verschluß des ersten Behälters befindliche Membran, das Suspensionsmedium vollständig zu den Partikeln gegeben werden und durch anschließendes Schütteln die injektionsfertige Suspension hergestellt werden. Als Suspensionsmedien kommen alle dem Fachmann bekannten injizierbaren Medien infrage, wie z.B. physiologische Kochsalzlösung, Wasser p.i. oder 5%ige Glukoselösung.
- 35

Die applizierte Menge richtet sich nach dem jeweilig eingeschlossenen Wirkstoff. Als orientierender oberer Grenzwert kann ein Wert angenommen werden, wie er auch bei

konventioneller Verabreichung des jeweiligen Wirkstoffs verwendet werden würde. Aufgrund des wirkungsverstärkenden Effekts sowie der Möglichkeit den Wirkstoff spezifisch aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären System freizusetzen, liegt die erforderliche Dosis im allgemeinen jedoch unter diesem oberen Grenzwert.

5

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

-10-

Beispiel 1: Coffein-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylat

Gasgefüllte Mikropartikel, die aus Butylcyanacrylsäure gemäß DE 38 03 972 hergestellt wurden, werden unter Zusatz von 2 % (m/V) Polyvinylalkohol gefriergetrocknet. Es werden ca.  $3 \cdot 10^9$  Partikel in Form des Lyophilisats zusammen mit 50 mg Coffein in einen Autoklaven gefüllt. Das Gemisch wird bei ca. 45 °C und 100-120 bar mit Kohlendioxid behandelt. Die Entfernung des überschüssigen Coffeins wird folgendermaßen durchgeführt: Die dem Autoklaven entnommenen Mikropartikel werden in 3 ml Wasser, das 1 % Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Partikel werden durch Zentrifugation abgetrennt und in 3 ml Wasser, das 1 % Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Zentrifugation mit anschließender Redispergierung in 3 ml Wasser, das 1 % Lutrol F 127 gelöst enthält, wird solange wiederholt, bis im Wasser kein Coffein mehr photometrisch bei 273 nm nachgewiesen werden kann.

15

Beispiel 2: Fibrinolytische Mikropartikel aus Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

2 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50:50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 10 mg r t-PA (Gewebsplasminogenaktivator) werden in 4 ml einer 4 %igen wässrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4 %igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4 %iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei -78 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf.

30

Beispiel 3: in vitro Freisetzung von Coffein durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 1 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von  $10^8$  Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des

35

B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer mittleren Schalleistung (Transmit  $\leq 20$  dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf Coffein bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit  $> 30$  dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun  
5 nachweisbares freies Coffein, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte.

Beispiel 4: in vitro Freisetzung von rekombinantem tissue Plasminogen Aktivator  
10 (r t-PA) durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 2 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von  $10^8$  Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines  
15 diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer geringen Schalleistung (Transmit  $\sim 10$  dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf r t-PA bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit  $> 30$  dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun  
20 nachweisbares freies r t-PA, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte. Die mit dem erhöhten Schalldruck behandelte Partikelsuspension weist fibrinolytische Eigenschaften auf.

25 Beispiel 5: Mitomycin-haltige Mikropartikel aus Polymilchsäure

2 g Polymilchsäure (MG ca. 20 000) werden in 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 20 mg Mitomycin werden in 15 ml 0,9 %iger wässriger Kochsalzlösung gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach  
30 vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 1 %igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG ca. 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen  $5\ \mu\text{m}$ -Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5 %igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon (MG ca. 10 000) in Wasser resuspendiert, bei  $-50^\circ\text{C}$  eingefroren  
35 und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als  $0,7\ \text{g/cm}^3$  auf. Sie eignen sich auch

als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Mitomycin frei.

Beispiel 6: Vincristinsulfat-haltige Mikropartikel aus Poly- $\epsilon$ -caprolacton

5  
2 g Poly- $\epsilon$ -caprolacton (MG ca. 40 000) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 10 mg Vincristinsulfat werden in 15 ml einer 5 %igen wässrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 5 %igen Lösung von  
10 Humanalbumin in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5 %igen Lösung von Humanalbumin in Wasser resuspendiert, bei  $-50^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch  
15 Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als  $0,7\text{ g/cm}^3$  auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Vincristinsulfat frei.

20

Beispiel 7: Ilomedin-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylsäurebutylester

3 g Polycyanacrylsäurebutylester werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 1 mg Ilomedin wird in 15 ml einer 5 %igen wässrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit  
25 einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 2,5 %igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer  
30 10 %igen Lösung von Lactose in Wasser resuspendiert, bei  $-50^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als  $0,7\text{ g/cm}^3$  auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem  
35 Ultraschall Ilomedin frei.

Beispiel 8: Methylenblau-haltige Mikropartikel aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

4 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50:50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingel-  
heim) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 20 mg Methylenblau werden in 4 ml einer  
5 4 %igen wässrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter  
Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach  
vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4 %igen autoklavierten  
Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei  
10 Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5  $\mu\text{m}$ -Filter  
filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4 %iger autoklavierter  
Gelatinelösung resuspendiert, bei  $-78^\circ\text{C}$  eingefroren und gefriergetrocknet. Nach  
Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000  
Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für  
15 Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als  $0,7\text{ g/cm}^3$  auf und  
setzen bei Beschallung mit Ultraschall (Schalldruck  $> 50\text{dB}$ , Frequenz  $2,5\text{MHz}$ )  
Methylenblau frei.

20 Beispiel 9: Nukleinsäurehaltige Mikropartikel (Markergen  $\beta$ -Gal +  
Albuminpromotor) aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

0,4 g Polyvinylpyrrolidon ( $k < 18$ ) und 2 g eines Copolymeren aus Milchsäure und  
Glykolsäure 50:50 werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Unter Rühren werden 5 ml einer  
25 Lösung von 300  $\mu\text{g}$  Markergen  $\beta$ -Gal mit Albuminpromotor in 0,9 %iger  
Kochsalzlösung zugegeben. Die entstandene Emulsion wird unter Rühren in 200 ml  
einer 2 %igen autoklavierten ( $121^\circ\text{C}$ , 20 min) Gelatinelösung überführt. Nach 3 h  
wird die entstandene Suspension in Portionen à 5 ml abgefüllt, bei  $-55^\circ\text{C}$  eingefroren  
und anschließend 70 h gefriergetrocknet. Die Vials werden nach Gefrier Trocknung mit  
30 je 5 ml Wasser resuspendiert und 3 h stehen gelassen. Die flotierten Partikel werden  
abgenommen in je 2 ml Wasser, das 10 % PVP enthält, resuspendiert und nach  
Einfrieren bei  $-55^\circ\text{C}$  erneut 90 h gefriergetrocknet.

Beispiel 10: In-vitro-Freisetzung von Nukleinsäure (Markergen  $\beta$ -Gal + Albuminpromotor) aus Mikropartikeln

- 1 Vial einer nukleinsäurehaltigen Mikropartikelpräparation, hergestellt nach  
5 Beispiel 9, wird mit 2 ml Wasser resuspendiert. 1 ml der Suspension wird mit  
Ultraschall behandelt (Probe 1), 1 ml wird nicht mit Ultraschall behandelt (Probe 2).  
Beide Proben werden zentrifugiert, die partikelarmen Phasen entnommen, durch einen  
0,2  $\mu$ m Filter filtriert. Die Filtrate werden mittels Gelelektrophorese auf ihren Gehalt  
an Markergen  $\beta$ -Gal untersucht. Das Filtrat aus Probe 1 enthält ca. 100 % mehr  $\beta$ -Gal  
10 als das Filtrat aus Probe 2.

Beispiel 11: In-vivo-Freisetzung von Nukleinsäure (Markergen  $\beta$ -Gal + Albuminpromotor) aus Mikropartikeln

- 15 2 Vials einer nukleinsäurehaltigen Mikropartikelpräparation, hergestellt nach Beispiel  
9 werden mit je 2 ml Wasser resuspendiert. Das gesamte Resuspendat wird der  
narkotisierten Ratte langsam i. v. (ca. 0,5 ml/min) appliziert. Während der  
Applikation erfolgt eine Beschallung (7,5 MHz) der Leber, welche bis zu 20 min nach  
20 Injektionsabschluß fortgeführt wird. 48 Stunden nach der Partikelgabe wird die Leber  
entnommen und bei -40 °C in Isopentan schockgefroren. Der enzymhistochemische  
Nachweis der neutralen  $\beta$ -Galaktosidase erfolgt an 8 - 10  $\mu$ m dicken Gefrierschnitten.  
Die Gegenfärbung wird mit Kernechtrot durchgeführt. Im Lebergefrierschnitt stellte  
sich die neutrale  $\beta$ -Galaktosidase - als Ergebnis der Genexpression - diffus verteilt als  
25 dunkelblaue Signale dar.



**Patentansprüche**

1. Wirkstoffhaltige Mikropartikel, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel neben dem Wirkstoff auch eine gasförmige Phase enthalten.
- 5 2. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichte der Partikel kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$  ist.
3. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet,  
10 daß die Partikelgröße  $0,1 - 10 \mu\text{m}$  ist.
4. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelhülle aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymeren aufgebaut ist.
- 15 5. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch abbaubares Polymer Proteine, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol, Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin,  
20 Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton oder deren Gemische verwendet wird.
- 25 6. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile von bakteriologischen Zellwänden, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, trombolytische Agentien, Tumornekrose Faktoren, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine, Glykoproteine, Hormone, Zytokine und/oder  
30 Prostaglandine enthalten ist.
7. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Zellen und/oder deren Bestandteile enthalten sind.
- 35 8. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß als gasförmige Phase Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, Edelgas, Ammoniak, halogenierte oder teilhalogenierte Kohlenwasserstoffe,  $\text{SF}_6$  und/oder Wasserdampf oder niedrigsiedende Flüssigkeiten (Sdp.  $< 37^\circ\text{C}$ ) enthalten sind.

9. Mikropartikuläre Systeme bestehend aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln nach Anspruch 1-8.
- 5 10. Mikropartikuläre Systeme nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenden Partikel durch Einstrahlung von diagnostischem Ultraschall unter Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs zerstört werden können.
- 10 11. Verfahren zur gezielten *in vivo* Wirkstofffreisetzung aus mikropartikulären Systemen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenden Partikel nach der Applikation mit diagnostischem Ultraschall bestrahlt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Frequenz des diagnostischen Ultraschalls 1 - 6 bevorzugt 1,5 - 5 MHz beträgt.
- 15 13. Verfahren zur Erhöhung des Transfers von Wirkstoffen in die Zielzellen, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff aus einem mikropartikulären Systemen mittels Ultraschall freigesetzt wird.
- 20 14. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß gashaltige Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas, bevorzugt in überkritischem Kohlendioxid, überkritischem Stickstoff, überkritischem Ammoniak sowie überkritischen Edelgasen, in einem Autoklaven behandelt, anschließend gewünschtenfalls gewaschen und gefriergetrocknet werden.
- 25 15. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01 - 20 % (m/V) gelöst wird und in diese Lösung eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert wird, daß eine Wasser in Öl Emulsion mit einer mittleren Teilchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10  $\mu\text{m}$  entsteht, wobei beide Lösungen gegebenenfalls zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten können und man anschließend diese Emulsion unter Rühren in das mindestens
- 30 gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gibt, das organische Lösungsmittel unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt, die so erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel falls gewünscht zunächst wäscht und anschließend, falls gewünscht
- 35

unter Zugabe von gerüstbildenden Hilfstoffen gefrier- bzw. sprühtrocknet und falls gewünscht in einem geeigneten Suspensionsmedium redispergiert und die Mikropartikel mit einer Dichte kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$  durch Flotation oder Zentrifugation abtrennt und falls erforderlich, gewünschtenfalls unter erneutem Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriertrocknet.

16. Verfahren zur Herstellung von mikrodispersen Systemen, dadurch gekennzeichnet, daß Mikropartikel nach Anspruch 1 in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium suspendiert werden.

17. Ein Kit bestehend aus einem ersten Behälter enthaltend die wirkstoff- und gashaltigen Mikropartikel nach Anspruch 1 und einem zweiten Behälter enthaltend eine pharmazeutisch verträgliche Trägerflüssigkeit, die nach Mischen mit dem Inhalt des ersten Behälters eine fließfähige injizierbare Suspension ergibt, wobei  
a) das Volumen des ersten Behälters so gewählt ist, daß zusätzlich zu den Partikeln auch die Trägerflüssigkeit vollständig Platz darin findet und b) beide Behälter jeweils eine Dosiseinheitsmenge an wirkstoffhaltigen Mikropartikeln bzw. Trägerflüssigkeit enthalten.

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup>:</b> <b>A61K 9/00, 9/16, 41/00, 49/00</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 95/07072</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 16. März 1995 (16.03.95)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP94/02806 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 25. August 1994 (25.08.94)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 30 958.5      9. September 1993 (09.09.93)      DE P 44 16 818.7      11. Mai 1994 (11.05.94)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WEITSCHIES, Werner [DE/DE]; Gneisenaustrasse 65, D-10961 Berlin (DE). HELDMANN, Dieter [DE/DE]; Krefelder Strasse 3, D-10555 Berlin (DE). HAUFF, Peter [DE/DE]; Stendaler Strasse 84, D-12627 Berlin (DE). FRITZSCH, Thomas [DE/DE]; Elisenstrasse 2, D-12169 Berlin (DE). STAHL, Harald [DE/DE]; Ringstrasse 41/42, D-12205 Berlin (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen einreffen.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 6. April 1995 (06.04.95)	
<b>(54) Title:</b> ACTIVE PRINCIPLES AND GAS CONTAINING MICROPARTICLES  <b>(54) Bezeichnung:</b> WIRKSTOFFE UND GAS ENTHALTENDE MIKROPARTIKEL  <b>(57) Abstract</b> <p>New active principle-containing microparticles are disclosed which contain besides the active principle(s) at least one gas or a gaseous phase. Also disclosed are agents containing said particles (microparticulate systems), their use for releasing active principles <i>in vivo</i> in an ultrasonically controlled manner, and processes for preparing the particles and the agents.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas oder eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten <i>in vivo</i> Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/02806

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K9/00 A61K9/16 A61K41/00 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 00933 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 21 January 1993 see page 39 - page 40; example 3 see claims 1-6 ---	1,3-7, 10,11,13
X	MACROMOLECULES, vol.25, 1992 pages 123 - 128 LIU L.-S. ET AL 'EXPERIMENTAL APPROACH TO ELUCIDATE THE MECHANISM OF ULTRASOUND-ENHANCED POLYMER EROSION AND RELEASE OF INCORPORATED SUBSTANCES' see page 123, column 2, paragraph 2 -paragraph 3 see page 125, column 1, paragraph 2 - page 126, column 1, paragraph 1 --- -/--	1,4-6,8, 10-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 1995

Date of mailing of the international search report

06.03.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Boulois, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/02806

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,5 190 766 (KEN ISHIHARA) 2 March 1993 see column 4, line 62 - column 5, line 2 see column 10, line 3 - line 47 see claims 1-6 ---	1,4, 10-13
X	EP,A,0 504 881 (TACHIBANA K. ET AL) 23 September 1992 see page 3, line 32 - line 38 see claims 4,5,7,8 ---	1,4-6, 8-11,13
A	WO,A,92 22298 (UNGER EVAN) 23 December 1992 cited in the application see page 31; examples 3,4 see page 33; example 9 see claims 1,4 ---	1
A	WO,A,92 19272 (THE DU PONT MERCK PHARMACEUTICAL COMPANY) 12 November 1992 cited in the application & US-A-5147631 see page 13, line 6 - line 14 see claims 1,5,6 ---	1
A	EP,A,0 327 490 (SCHERING A.G.) 9 August 1989 cited in the application & DE-A-3803972 see column 3, line 53 - column 4, line 4 -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/02806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9300933	21-01-93	AU-A- 2317592	11-02-93
		CA-A- 2112905	21-01-93
		EP-A- 0593627	27-04-94
		FI-A- 940028	25-02-94
		JP-T- 6511481	22-12-94
		NO-A- 940011	22-02-94
US-A-5190766	02-03-93	JP-A- 3297475	27-12-91
EP-A-0504881	23-09-92	JP-A- 5078260	30-03-93
		US-A- 5315998	31-05-94
WO-A-9222298	23-12-92	AU-A- 2023892	12-01-93
		CA-A- 2110490	23-12-92
		JP-T- 6508617	29-09-94
WO-A-9219272	12-11-92	US-A- 5147631	15-09-92
		AU-A- 2002892	21-12-92
		EP-A- 0583401	23-02-94
EP-A-0327490	09-08-89	DE-C- 3803971	07-09-89
		DE-A- 3803972	10-08-89
		AT-T- 109663	15-08-94
		AU-B- 635200	18-03-93
		AU-A- 3035189	25-08-89
		WO-A- 8906978	10-08-89
		DE-D- 58908194	22-09-94
		EP-A- 0398935	28-11-90
		EP-A- 0586875	16-03-94
		JP-T- 3503634	15-08-91
		PT-B- 89635	28-02-94



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen  
PCT/EP 94/02806

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A61K9/00 A61K9/16 A61K41/00 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 00933 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 21. Januar 1993 siehe Seite 39 - Seite 40; Beispiel 3 siehe Ansprüche 1-6 ---	1,3-7, 10,11,13
X	MACROMOLECULES, Bd.25, 1992 Seiten 123 - 128 LIU L.-S. ET AL 'EXPERIMENTAL APPROACH TO ELUCIDATE THE MECHANISM OF ULTRASOUND-ENHANCED POLYMER EROSION AND RELEASE OF INCORPORATED SUBSTANCES' siehe Seite 123, Spalte 2, Absatz 2 -Absatz 3 siehe Seite 125, Spalte 1, Absatz 2 - Seite 126, Spalte 1, Absatz 1 --- -/--	1,4-6,8, 10-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06.03.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Boulois, D

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/02806

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US,A,5 190 766 (KEN ISHIHARA) 2. März 1993 siehe Spalte 4, Zeile 62 - Spalte 5, Zeile 2 siehe Spalte 10, Zeile 3 - Zeile 47 siehe Ansprüche 1-6 ---	1,4, 10-13
X	EP,A,0 504 881 (TACHIBANA K. ET AL) 23. September 1992 siehe Seite 3, Zeile 32 - Zeile 38 siehe Ansprüche 4,5,7,8 ---	1,4-6, 8-11,13
A	WO,A,92 22298 (UNGER EVAN) 23. Dezember 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 31; Beispiele 3,4 siehe Seite 33; Beispiel 9 siehe Ansprüche 1,4 ---	1
A	WO,A,92 19272 (THE DU PONT MERCK PHARMACEUTICAL COMPANY) 12. November 1992 in der Anmeldung erwähnt & US-A-5147631 siehe Seite 13, Zeile 6 - Zeile 14 siehe Ansprüche 1,5,6 ---	1
A	EP,A,0 327 490 (SCHERING A.G.) 9. August 1989 in der Anmeldung erwähnt & DE-A-3803972 siehe Spalte 3, Zeile 53 - Spalte 4, Zeile 4 -----	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/02806

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9300933	21-01-93	AU-A- 2317592	11-02-93
		CA-A- 2112905	21-01-93
		EP-A- 0593627	27-04-94
		FI-A- 940028	25-02-94
		JP-T- 6511481	22-12-94
		NO-A- 940011	22-02-94
US-A-5190766	02-03-93	JP-A- 3297475	27-12-91
EP-A-0504881	23-09-92	JP-A- 5078260	30-03-93
		US-A- 5315998	31-05-94
WO-A-9222298	23-12-92	AU-A- 2023892	12-01-93
		CA-A- 2110490	23-12-92
		JP-T- 6508617	29-09-94
WO-A-9219272	12-11-92	US-A- 5147631	15-09-92
		AU-A- 2002892	21-12-92
		EP-A- 0583401	23-02-94
EP-A-0327490	09-08-89	DE-C- 3803971	07-09-89
		DE-A- 3803972	10-08-89
		AT-T- 109663	15-08-94
		AU-B- 635200	18-03-93
		AU-A- 3035189	25-08-89
		WO-A- 8906978	10-08-89
		DE-D- 58908194	22-09-94
		EP-A- 0398935	28-11-90
		EP-A- 0586875	16-03-94
		JP-T- 3503634	15-08-91
		PT-B- 89635	28-02-94